

M. H

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :  C12N 15/49, C07K 14/16, A61K 39/21, G01N 33/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/08167  (43) Date de publication internationale: 17 février 2000 (17.02.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01871  (22) Date de dépôt international: 29 juillet 1999 (29.07.99)		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Données relatives à la priorité:  98/10027 31 juillet 1998 (31.07.98) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).			
(72) Inventeur; et  (75) Inventeur/Déposant ( <i>US seulement</i> ): CHEVALIER, Michel [FR/FR]; 19, rue de la Guillotière, F-38270 Beaurepaire (FR).			
(74) Mandataire: GROS, Florent; Pasteur Mérieux Sérum & Vaccins, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).			

(54) Title: TRIMER OF HIV ENV GENE EXPRESSION PRODUCT

(54) Titre: TRIMERE DU PRODUIT D'EXPRESSION DU GENE ENV DE HIV

## (57) Abstract

The invention concerns a purified recombinant glycoprotein having the following properties: a) an adherence capacity to CD4; b) an affinity with a anti-gp120 antibody capable of neutralising *in vitro* HIV cell infection; c) an affinity with an anti-gp41 antibody; d) a trimeric form free from inter-chain disulphide bonds. The invention also concerns a vaccine comprising said purified glycoprotein and an adjuvant. The invention further concerns a method for obtaining said glycoprotein as per Claim 1, which consists in expressing, by means of genetic recombining techniques, a glycoprotein corresponding to the properties a), b) and c) mentioned in Claim 1; purifying it, and subjecting it to steps involving at least a reducing agent, an ionic detergent and/or a neutral detergent in conditions leading to a glycoprotein having said properties.

## (57) Abrégé

Glycoprotéine recombinante purifiée répondant aux propriétés suivantes: a) une capacité d'adhésion au CD4; b) une affinité avec un anticorps anti-gp120 capable de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV; c) une affinité avec un anticorps anti-gp41; d) une forme trimérique dépourvue de ponts disulfures inter-châînes. Vaccin comprenant la glycoprotéine purifiée selon l'invention et un adjuvant. Procédé d'obtention d'une glycoprotéine selon la revendication 1, dans lequel on exprime, au moyen de techniques de recombinaison génétique, une glycoprotéine répondant aux propriétés a), b) et c) énoncées à la revendication 1, on la purifie, et on la soumet à des étapes impliquant au moins un agent réducteur, un détergent ionique et/ou un détergent neutre dans des conditions telles que l'on obtient une glycoprotéine besoins de l'invention.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## Trimère du produit d'expression du gène *env* de HIV

La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention de protéines recombinantes, ayant pour origine la membrane du virus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), permettant la restauration de leur forme trimérique native, ainsi que l'utilisation de ces protéines dans un but de vaccination ou de diagnostique.

### Estat de la technique

10

La glycoprotéine de l'enveloppe de HIV est codée par le gène "env", et la traduction de l'ARNm correspondant donne une protéine glycosylée, gp160, sous forme d'un précurseur dont la masse moléculaire est de 160 kDa. La gp160 est clivée à l'intérieur de la cellule pour donner, au niveau de la membrane cytoplasmique lors du bourgeonnement du virus en cours de formation, d'une part la gp120 que l'on retrouve à l'extérieur de la cellule et du virus, et, d'autre part, la gp41, partie transmembranaire de la glycoprotéine, qui correspond à l'extrémité carboxy-terminale du précurseur. Une fois la particule virale libérée, la gp41 seule protéine transmembranaire, présentera son extrémité carboxy-terminale tournée vers l'intérieur du virus et son extrémité amino-terminale faisant saillie à l'extérieur, se maintenant associée de façon non covalente à la gp120. Par son extrémité amino-terminale, elle est fixée d'une manière non covalente à la gp41 alors que le reste de la protéine est impliqué dans la reconnaissance du récepteur CD4 et des co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 (spécifique des lymphocytes T4 auxiliaires, macrophages ; Trkola *et al.*, J. Virol., 72, 1876-85, 1998 ; Schols *et al.*, J. Virol., 72, 4032- 4037, 1998 ; Rubbert *et al.*, J. Immunology, 160, 3933-3941, 1998). La liaison de la gp120 au CD4 permet d'exposer la membrane de la cellule cible à la partie hydrophobe amino-terminale de la gp41, ce qui induit le mécanisme de fusion des membranes du virus et des cellules, cette fusion étant à l'origine de la pénétration du virion dans la cellule cible lors de l'infection (Wong-Staal *et al.*, In Molecular Genetic Medicine, 2, Friedman ed., 189-219, 1992 ; Berger *et al.*, Nature, 391: 240, 1998).

35

Ce processus de reconnaissance du récepteur viral, suivi de la fusion des membranes grâce à l'interaction de l'extrémité amino-terminale de la protéine de fusion avec la membrane de la cellule cible, n'est pas un mécanisme propre au HIV. Il est rendu possible grâce à la présence, sous forme oligomérique, des glycoprotéines transmembranaires du virus. Des pontages par agents chimiques ont permis de mettre

en évidence des trimères au niveau des glycoprotéines de l'enveloppe de MuLV (Pinter *et al.*, J. Virol., 30, 157-165, 1979), de MuMTV (Racevskis *et al.*, J. Virol., 35, 937-948, 1980). Il a aussi été montré que la protéine de l'enveloppe de RSV forme des oligomères retrouvés dans les cellules infectées et les particules virales (Einfeld *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8688-8692, 1988). Le virus de l'influenza exprime également à sa surface une hémagglutinine sous forme trimérique. Dans ce dernier cas, la forme multimérique est nécessaire au transport intracellulaire de la protéine (Copeland *et al.*, J. Cell. Biol., 103, 1179-1191, 1986). L'influenza exprime aussi à sa surface une neuraminidase sous forme de tétramère (Varghese *et al.*, Nature, 303, 35-40, 1983).

Bien que la nature oligomérique des différentes protéines codées par le gène *env* ne fait aucun doute, le nombre de monomère est resté quant à lui sujet à controverse pendant longtemps. La glycoprotéine gp160 a en effet été décrite longtemps comme pouvant s'assembler en dimères ou tétramères (Pinter *et al.*, J. Virol., 63, 2674-2679, 1989; WO94/00557 du CNRS; Schawaller *et al.*, Virology, 172, 367-369, 1989; Earl *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 648-652, 1990; Earl *et al.*, J. Virology, 68, 3015-3026, 1994). D'autres rapports plus récent ont toutefois démontré que la gp160 pourrait s'associer en fait naturellement, par sa partie gp41, sous la forme de trimères (Min Lu *et al.*, Nature Structural Biology, 2, 1075-1082, 1995; Weisshorn *et al.*, EMBO J., 15, 1507-1514, 1996; Weisshorn *et al.*, Nature, 387, 426-430, 1997), les formes dimériques ou tétramériques résultant en fait de ponts disulfures inter-chaînes aberrants, ou de formes oligomériques transitoires (voir ci-dessous).

25

Dans un but vaccinal, on peut produire et purifier la glycoprotéine de l'enveloppe de HIV, soit en cultivant le virus HIV sur des lignées cellulaires et en purifiant la glycoprotéine du milieu de culture (WO94/00557 du CNRS), soit en exprimant un recombinant de cette protéine par un vecteur différent de l'HIV, et en la purifiant du milieu de culture (WO91/13906, Chiron).

30

La purification de gp160 à partir de cellules infectées par HIV ne permet que d'obtenir des tétramères, probablement une forme oligomérique transitoire, c'est à dire une forme qui ne correspond pas à celle prise par sa partie gp41 à la surface du virus (WO94/00557 du CNRS).

L'expression d'un recombinant de la gp160 par un vecteur différent de l'HIV, bien que présentant l'avantage de se soustraire aux dangers liés à l'agent infectieux HIV, ne permet pas aussi de retrouver la structure oligomérique "native" de la gp160. En effet, VanCott *et al.* ont montré que la gp160 recombinante exprimée par la vaccine, bien que présentant un pouvoir d'adhésion au CD4, comporte des différences structurelles (*J. Imm. Meth.*, 183, p. 114, col. 1, li. 19-22, 1995). Randall *et al.* ont également montré que la gp160 recombinante exprimée par la vaccine comporte des ponts disulfures inter-chaînes abbérants (*Virology*, 179, 827-833, 1990).

Récemment, Parren *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre l'obtention d'anticorps pouvant neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV et la nature oligomérique de la gp120 (*J. of Virology*, 72, 3512-3519, 1998). Pour cela, Parren *et al.* ont utilisé une gp120 exprimée par HIV dans des cellules infectées, probablement pour contourner les problèmes liés aux différences structurales entre une gp120 native, exprimée à la surface du HIV, et celles produites par des vecteurs d'expression, telle que la vaccine.

Par ailleurs, on sait que des anticorps spécifiques de la structure oligomérique de la gp160 peuvent être générées (Earl *et al.*, *supra*), et participent de fait à un effet neutralisant contre l'infection *in vitro* de cellules par le HIV.

La présente invention vise à fournir un procédé d'obtention de produits d'expression du gène *env* recombinant permettant la restauration de leur forme trimérique, cette forme étant utilisable dans le cadre d'une vaccination ou dans la mise en œuvre d'un diagnostic d'infection par HIV. En effet, les essais cliniques conduits sur des gp160 recombinantes posent le problème du spectre d'inhibition qui reste limité à quelques souches virales uniquement (Pialoux *et al.*, *Aids Res. Hum. Retr.*, 11, 373-381, 1995 ; Salmon-Céron *et al.*, *Aids Res. Hum. Retr.*, 12, 1479-1486, 1995).

30

A ce jour, bien que la forme trimérique d'une gp160 a été plusieurs fois identifiée dans un mélange d'autres formes polymériques, personne n'a purifié, ni suggéré de purifier, la forme trimérique de la gp160. La présente vise à pallier ce besoin.

35

Résumé de l'invention

A cet effet, l'invention concerne toute glycoprotéine recombinante purifiée répondant aux propriétés suivantes :

- a) une capacité d'adhésion au CD4 ;
- b) une affinité avec un anticorps anti-gp120 capable de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV ;
- c) une affinité avec un anticorps anti-gp41 ;
- d) une forme trimérique dépourvue de ponts disulfures inter-chaines

10 Un deuxième objet de la présente invention concerne un vaccin comprenant la glycoprotéine purifiée selon l'invention, et un adjuvant.

15 Un troisième objet de la présente invention concerne l'utilisation de la glycoprotéine selon l'invention dans la mise en œuvre de toute méthode de diagnostic *in vitro* d'infections causées par HIV.

20 Un dernier objet de la présente invention concerne un procédé d'obtention d'une glycoprotéine selon l'invention, dans lequel on exprime, aux moyen de techniques de recombinaison génétique, une glycoprotéine répondant aux propriétés a), b) et c) selon l'invention, on la purifie, et on la soumet à des étapes impliquant au moins un agent réducteur, un détergent ionique et/ou un détergent neutre dans des conditions telles que l'on obtient une glycoprotéine répondant aux conditions selon l'invention.

25 Description détaillée de l'invention

30 Dans le cadre de la présente invention, la capacité d'adhésion au CD4 peut être déterminée par une précipitation radio-immune, par ELISA ou par résonance plasmonique de surface, le détail des ces méthodes étant exposé dans la suite de la description. Ces méthodes sont susceptibles d'être modifiées dans la limite des connaissances actuelles, l'objectif étant de s'assurer simplement que la glycoprotéine selon l'invention forme bien un complexe avec le CD4.

35 Les molécules de CD4 peuvent être préparées de toutes sortes de manières différentes, incluant une purification depuis une source naturelle, ou le recours à des techniques de recombinaison génétique. Dans ce cadre, on peut utiliser les CD4 décrits dans WO8903222, WO8902922, Smith *et al.* (*Science*, 238, 1704-1707, 1987)

et Littman *et al.* (*Nature*, 325, 453-455, 1987), par exemple. La société ERC BioServices Corporation, 649A Lofstrand Lane, Rockeville, MD 20850, USA, commercialise également un CD4 produit par les cellules CHO ST4.2 (*In* : Aids Research and Référence Reagent Program Catalog, the Nat. Inst. Helath U.S.D.H.H.S.), par exemple.

De préférence, la capacité d'adhésion est au moins identique à celle d'une gp120 d'une souche d'HIV infectieux, par exemple une gp120 provenant des isolats SF2, HXB2, BRU, MN, SC, NY5, CDC4, WMJ2, RF, MAL, ELI, Z96, Z3, Z321 et JY15 (Myers *et al.*, *Human Retroviruses and Aids*, Los Alamos, New Mexico, 1990), ou des autres isolats décrits par Tersmette *et al.* (*J. Virol.*, 62, 2026-2032, 1988), Popovic *et al.* (*Science*, 224, 497-500, 1984), et EP541753 (Transgène S.A.), par exemple.

L'affinité mesurée ( $K_d$ ) par résonance plasmonique de surface peut être aussi de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-12}$  M, de préférence  $10^{-9}$  à  $10^{-11}$  M, ce qui est conforme aux affinités déjà mesurées pour des gp120 (Smith *et al.*, *Science*, 238: 1704, 1987 ; Lasky *et al.*, *Cell*, 50: 975, 1987), par exemple.

La glycoprotéine recombinante selon l'invention présente aussi une affinité avec un anticorps anti-gp120 capable de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV. Le terme "anticorps" regroupe toutes les immunoglobulines ou fragments de celles-ci, d'original polyclonale, monoclonale ou chimérique (voir US4816397), par exemple. Tous les anticorps connus, ou susceptibles d'être préparés, capables de reconnaître un épitope de la gp120 et de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par un HIV, peuvent être pris en compte dans le cadre de la présente invention. Il suffit qu'une glycoprotéine du HIV présente une affinité avec un anticorps de ce type pour qu'on la considère comme répondant aux besoins de la présente invention. Sans vouloir être limité par les techniques et anticorps utilisables pour les besoins de l'invention, à titre d'information, on peut citer les articles de VanCott *et al.* (1995, *supra*), et Earl *et al.* (1994, *supra*), par exemple.

En ce qui concerne les tests de mesure de l'efficacité neutralisante d'un anticorps *in vitro*, on peut citer les articles de Pialoux *et al.* (1995, *supra*) et Salmon-Céron *et al.* (1995, *supra*), par exemple. Il suffit d'observer une neutralisation *in vitro* de l'infection de cellules par HIV, quelque soit le seuil de neutralisation, pour considérer que l'anticorps satisfait aux besoins de la présente invention.

5 Par ailleurs, la glycoprotéine recombinante selon l'invention présente aussi une affinité avec un anticorps anti-gp41. Les remarques exposées ci-dessus s'applique *mutatis mutandis* à la gp41, à la différence près que l'effet neutralisant d'un anticorps anti-gp41 n'est pas important, tout en pouvant être un critère préférentiel à ne pas négliger.

10 La mesure de l'affinité de la glycoprotéine sous forme trimérique avec les anticorps anti-gp41 et anti-gp120 peut être effectuée par une réaction immunologique direct avec l'anticorps, ou par ELISA, par exemple. Les conditions opératoires peuvent varier dans les limites des connaissances actuelles, les variations et/ou adaptations par rapports aux techniques connues ne représentant pas en fait un obstacle difficile pour l'homme du métier.

15 La forme trimérique de la glycoprotéine selon l'invention peut être observée sur gel SDS PAGE en condition réductrice ou non (voir l'exemple 1). L'homme du métier peut cependant recourir à toutes sortes d'autres analyses, comme la centrifugation analytique ou l'analyse par diffusion de la lumière. L'objectif est simplement de mettre en évidence l'association de trois molécules de gp160 non-liées 20 par des ponts inter-chaînes.

25 La glycoprotéine selon l'invention, en répondant aux propriétés exposées ci-dessus, peut donc être composée de tout ou partie de la protéine gp41, et de tout ou partie de la protéine gp120. De ce fait, cette glycoprotéine peut être codée par tout ou partie d'un gène *env*, natif (provenant d'un isolat d'HIV) ou non, ladite glycoprotéine étant soit purifiée à un stade où le clivage n'est pas encore effectué *in situ*, ou ledit clivage étant rendu inopérant soit à cause de la nature de l'hôte cellulaire qui ne serait pas pourvu des enzymes nécessaires, soit à cause d'inhibiteurs de ces enzymes, soit 30 encore du fait que le site de clivage a été génétiquement modifié, par exemple.

35 La modification génétique du site de clivage est bien connu de l'homme du métier, et permet d'obtenir des protéines entières, de tailles variables, renfermant tout ou partie de la gp41 et tout ou partie de la gp41. A titre d'information, non limitative, on peut citer les glycoprotéines gp160 et gp140 décrites par EP541753 (*supra*), EP679187 (*supra*), Earl *et al.* (1994, *supra*), Kieny *et al.* (1988, *supra*), l'enseignement technique de cette littérature étant incorporé par référence dans la description de la présente invention.

Plus particulièrement, on peut utiliser comme source de gène *env*, tous les isolats de HIV connus, notamment ceux décrits ci-dessus. Le clonage peut être avantageusement effectué par la technique PCR, suivie d'une insertion du fragment d'ADN dans un vecteur approprié. On peut ensuite supprimer le(s) site(s) de clivage par mutagenèse dirigée comme décrit par Kieny *et al.* (1988, *supra*), ou dans l'exemple 1 ci-après. La préparation des vecteurs, et toutes les autres procédures techniques peuvent être effectuées selon les protocoles décrits dans les ouvrages de Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989).

Le vecteur d'expression dans lequel on clone finalement le fragment d'ADN codant pour une glycoprotéine selon l'invention, peut être un plasmide, un phage, un ADN entier de virus, un cosmide, un ADN destiné à s'intégrer dans une cellule, etc. Ce vecteur comprend de préférence des séquences régulant l'expression du gène *env*, et le cas échéant d'autres séquences régulant la translocation de la glycoprotéine vers la membrane de la cellule hôte productrice. Les cellules hôtes les plus adaptées, en raison d'un glycosylation proche voire identique à celle désirée, sont des cellules eucaryotes supérieures, pouvant inclure, par exemple, des lignées cellulaires immortalisées provenant du singe (Cos-7, ATCC CRL 1651 ; Vero76, ATCC CRL 1587), du hamster (BHK, ATCC CRL 10 ; CHO, PNAS USA, 77 :4216, 1980), de la souris (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23, 243-251, 1980), de l'homme (HeLa, ATCC CCL2 ; W138, ATCC CCL75 ; Hep G2 ; HB 8065), du chien (MDCK, ATCC CCL34), etc.

25

Les vecteurs d'expression les plus appropriés sont ceux se reproduisant dans des eucaryotes, notamment le virus de la vaccine qui est bien connu dans l'art antérieur (WO86/07593), par exemple.

30

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, on peut produire notamment des gp160 selon l'enseignement décrit dans EP541753 (*supra*), ou des gp140 selon la méthode de Earl *et al.* (1990, *supra*), voire tout autre variant de glycoprotéine dans laquelle une ou plusieurs parties de gp41 et/ou gp120 seraient éliminées, l'objectif étant que la partie gp41 soit suffisante pour que la formation de trimères s'effectue, et que la partie gp120 soit suffisante pour être reconnue par des anticorps anti-gp120 neutralisants et par le CD4. Pour faire le choix de gènes *env* modifiés répondant aux besoins de la présente invention, l'homme du métier, est à

même de procéder par étape ou par hasard, et de choisir ensuite parmi toutes les séquences ne répondant pas à nos besoins, celles qui y satisfont.

Après avoir produit la glycoprotéine par des techniques de recombinaison génétique, ou par infection de cellules avec HIV, on la purifie au moyen de techniques connues de l'homme du métier, notamment celles faisant intervenir des lectines de lentille (Pialoux *et al.*, 1995, *supra*; Salmon-Céron *et al.*, 1995, *supra*), celle décrite dans WO91/13906 (*supra*) pouvant être éventuellement encore adaptée aux besoins de la présente invention, ou même celle décrite à l'exemple 1 (immuno-affinité), par exemple.

Rn ce qui concerne les protéines recombinantes, on peut noter qu'une partie des glycoprotéines ainsi purifiées présentent des ponts disulfures inter-chaînes, quelque soit la nature de l'hôte ou du vecteur utilisé. Les glycoprotéines s'associent en fait en dimères (une partie étant covalents) visibles sur gel SDS PAGE après fixation par un agent de pontage. En ce qui concerne les glycoprotéines purifiées de cellules infectées par HIV, celles-ci se présentent aussi sous forme de tétramères (WO94/00557, *supra*).

Afin de répondre aux besoins de la présente invention, on dissocie donc les glycoprotéines, puis on les soumet à des conditions favorisant leur ré-assemblage naturel, c'est à dire sous forme de trimères. Pour cela, on soumet la glycoprotéine à des étapes impliquant au moins un agent réducteur, un détergent ionique et/ou un détergent neutre dans des conditions telles que l'on obtient une glycoprotéine satisfaisant aux besoins de la présente invention.

On peut choisir un ou plusieurs agent(s) réducteur(s) parmi les molécules de dithiothréitol, β-mercaptopropanoïde, glutathion réduit ou le borohydrure de sodium, par exemple.

On peut choisir un ou plusieurs détergent(s) ionique(s) parmi les sels de dodécylique sulfate, notamment le dodécylique sulfate de sodium (SDS) ou de lithium, les sels de dioctyl sulfosuccinate (de sodium, par exemple), les sels de cétryltriméthylammonium (de brome, par exemple), les sels de cétylpyridinium (de chlore, par exemple), les N-dodécyls- ou N-tétradécylique-sulfobétaïne, les zwittergents 3-14, et le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-1-propane sulfonate (CHAPS), par exemple.

De même, on peut choisir un ou plusieurs détergent(s) neutre(s) parmi le tween20®, le tween80®, l'octylglucoside, le lauryl-malatoside, l'hecameg®, le lauryl-diméthylamine, le décanoïl-N-méthyl-glucamide, le polyéthylène-glycol-lauryl-éther, 5 le triton X100®, le Lubrol PX®, par exemple.

Les conditions opératoires doivent être suffisantes pour dissocier les glycoprotéines, et les ré-assembler en trimères. Pour cela, généralement on peut dissocier les glycoprotéines à l'aide d'un ou plusieurs détergent(s) ionique(s), en 10 présence d'agent réducteur ou non, puis on peut favoriser le réassemblage des monomères en substituant le détergent ionique par un détergent neutre, par exemple au moyen d'une dialyse. De cette manière, on est assuré d'obtenir une glycoprotéine selon l'invention comprenant moins de 50% d'autres contaminants protéiques 15 (constitués principalement par des dimères covalents)

15

De préférence, pour obtenir exclusivement des trimères de glycoprotéines selon l'invention, on soumet au cours du traitement les glycoprotéines purifiées à un agent réducteur, de sorte à libérer les dimères covalents, le cas échéant on bloque des fonctions sulfhydryls libres au moyen de molécules appropriées, telles que des agents 20 d'alkylation comme le N-éthyl-maléimide ou l'iodo-acétamide, puis on ré-oxyde doucement les fonctions sulfhydryls restantes en présence d'un agent oxydant tel que du glutathion oxydé, par exemple.

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, on peut 25 soumettre la glycoprotéine purifiée successivement à un agent réducteur, à un agent d'alkylation, à un agent oxydant, à un détergent ionique et à une dialyse contre un détergent neutre, par exemple

Dans un autre mode de réalisation particulier de la présente invention, on peut 30 soumettre la glycoprotéine purifiée successivement à un détergent ionique, à un agent réducteur, à un agent oxydant et à une dialyse contre un détergent neutre.

A la fin du procédé, on peut substituer le détergent neutre par un tampon approprié, par exemple au moyen d'une dialyse.

35

Un autre objet de la présente invention concerne un vaccin comprenant la glycoprotéine selon la présente invention et un adjuvant. Ce vaccin peut contenir

comme antigène de surface du HIV uniquement la glycoprotéine selon la présente invention, les formes dimériques ou monomériques d'une gp160 ou gp120 étant spécifiquement exclues, par exemple, pour des raisons d'immunogénicité réduites. On peut également adjoindre à ce vaccin d'autres valences concernant d'autres maladies, les quantités d'antigènes et/ou la formulation de chaque valence devant néanmoins être probablement optimisée(s) de sorte à assurer une réponse immunitaire efficace, par exemple. Les valences d'autres pathogènes peuvent provenir de bactéries, de virus ou de parasites, par exemple ceux provoquant des hépatites (A à G), la rougeole, les oreillons, la polio, la tuberculose, la diphtérie, la malaria, etc.

10

Parmi les adjuvants utilisables, on peut dénombrer tous les sels d'aluminium, comme les phosphates et hydroxydes d'aluminium : l'adjuvant de Freund ; le N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanine-2-[1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-(hydroxyphosphoryloxy)] (voir Sanchez-Pescador *et al.*. J. Immu., 141, 1720-1727, 1988) ; les molécules dérivées de *Quillaja saponaria*, comme le Stimulon® (Aquila, US) ; l'Iscoms® (CSL Ltd, US) ; toutes molécules à base cholestérol et analogues, comme le DC Chol® (Targeted Genetics) ; le glycolipide Bay R1005® (Bayers, DE) ; les antigènes de *Leishmania brasiliensis* comme le LeIF (nom technique) disponible auprès de Corixa Corp. (US), les polymères de la famille de polyphosphazènes, comme l'Adjumer (nom technique) disponible auprès du "Virus Research Institute" (US).

Les compositions vaccinales selon l'invention peuvent être utilisées pour la prévention d'infections par le HIV-1, le dosage et la voie et la fréquence d'administration devant cependant être probablement optimisé de sorte à obtenir une réponse immunitaire efficace.

Un dernier objet de la présente invention concerne l'utilisation de la glycoprotéine selon l'invention dans la mise en œuvre de toute méthode de diagnostic *in vitro* d'infections causées par HIV.

D'autres caractéristiques de la présente invention apparaîtront au cours des descriptions suivantes d'exemples de formes de réalisation qui sont fournis à des fins d'illustration de la présente invention et qui ne sont pas destinés à être limitatifs. La manipulation des cellules, la préparation des vecteurs, la transformation de cellules, et toutes les autres procédures techniques sont, en l'absence de précisions contraires, effectués selon les protocoles décrits dans l'ouvrage de Sambrook *et al.* (1989, *supra*).

Ces exemples sont précédés d'une brève description de la figure 1, et des méthodes mesurant l'affinité de la gp160 au CD4.

Mise en évidence d'une affinité au CD4 par précipitation radio-immune : on utilise un

5 CD4 recombinant marqué au soufre 35 produit par des cellules CHO (Genentech, USA ; VanCott *et al.*, 1995, *supra*). On effectue ensuite des expériences de co-précipitation, au cours desquelles le CD4 est ajouté en quantité croissante à une quantité fixe de gp160 purifiée sous forme trimérique pour déterminer le point de saturation, puis on les coprécipite avec un antisérum anti-gp160. Pour cela, on 10 mélange le CD4 et la gp160 pendant 1 h à 4°C, on ajoute l'anticorps (OKT4, Ortho Diagnostics, US), on lave les complexes, et on les sépare par électrophorèse.

Mise en évidence d'une affinité au CD4 par ELISA : la mesure des constantes d'affinité du CD4 pour la glycoprotéine selon l'invention est mesurée en utilisant la 15 technique de Friguet *et al.* (*J. of immunological methods*, 77, 305-319, 1985).

Mesure de l'affinité de la gp120 sur le CD4 par résonance plasmonique de surface : le

Biacore® est un appareil pour l'analyse des interactions biospécifiques en temps réel et sans marquage qui utilise le principe de résonance plasmonique de surface. Lors de 20 l'analyse, un des interactants (le ligand) est couplé à une matrice hydrophile (dextran) ou hydrophobe (surface HPA). L'autre interactant (analyte) passe au contact de la surface par l'intermédiaire d'une cartouche de transfert microfluidique. L'augmentation de masse au voisinage de la surface due à l'interaction entre les molécules, est représentée en fonction du temps sur un sensorgramme. Différentes 25 chimies de couplage permettent la fixation de pratiquement toutes les biomolécules sur la matrice. L'utilisateur crée donc une surface biospécifique sur mesure, pour chaque type d'application. En pratique la glycoprotéine selon l'invention est couplée sur la matrice et différentes concentrations de CD4 sont envoyées par l'appareil au contact de cette matrice. A chaque fois la masse de CD4 fixée sur la glycoprotéine est 30 enregistrée. Le logiciel Biaeal3® calcule automatiquement la constante de dissociation du CD4 sur la gp120.

Figure 1 : représentation de l'analyse SDS PAGE en condition réductrice obtenue avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée, traitée pour faire des trimères et fixée par un agent de pontage (col. 3 et 4) ; au regard de celle obtenue en condition

35 réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée et directement fixée (col. 2) ; au regard de celle obtenue en condition réductrice avec des monomères de gp160

(col. 5 et 6) ; et au regard de celle obtenue en condition non-réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150 et purifiée (col. 7).

### Exemple 1

5

Un vecteur recombinant basé sur le virus de la vaccine, VVTG9150, est utilisé pour la production de gp160. La construction du plasmide de transfert du gène codant pour la protéine *env* hybride HIV-1<sub>MN/LAI</sub> dans le génome du virus de la vaccine VVTG9150 est décrite ci-après.

10

Le fragment d'ADN *PstI-KpnI* de pTG1163, réf. Kieny *et al.* (Prot. Eng., 2, 219-225, 1998) qui contient la séquence codant pour le peptide signal et les premiers acides aminés de la gp120 du virus HIV-1<sub>LAI</sub>, est inséré aux sites *PstI* et *KpnI* du bactériophage M13TG130, réf. Kieny *et al.* (Gene, 26, 91-99, 1983) générant 15 M13TG4147. Le fragment *PstI-PstI* de pTG1163, contenant la totalité du gène codant pour une gp160/soluble de HIV-1<sub>LAI</sub> est introduit dans le site de restriction *PstI* de M13mp70, générant M13TG4137. L'ADN du bactériophage M13TG4137 est ensuite coupé par *BgIII*, digéré par la polymérase I (fragment de Klenow) afin de générer une extrémité franche, puis coupé par *EcoRI*, afin d'être inséré aux sites *EcoRV* et *EcoRI* 20 du bactériophage M13TG4147, générant M13TG4158. Une délétion sur M13TG4158 est ensuite réalisée avec un oligonucléotide, qui permet l'introduction d'un site *SphI* et d'un site *SmaI*. On obtient le bactériophage M13TG4168. Le gène codant pour la gp120<sub>MN</sub> est ensuite amplifié à partir d'ADN de cellules SupT1 infectées avec le virus HIV-1<sub>MN</sub> par la technique de PCR avec des oligonucléotides qui introduisent 25 respectivement des sites *SphI* et *SmaI*. Le fragment d'ADN amplifié est ensuite digéré par *SphI* et *SmaI* et inséré aux sites correspondant de M13TG4168, générant M13TG4174. Une mutagénèse dirigée sur M13TG4174 est réalisée avec un oligonucléotide permettant de muter un site potentiel d'arrêt de transcription (TTTTTNT) reconnu par le virus de vaccine dans les gènes précoces et d'introduire un 30 site de restriction *EcoRI*, générant ainsi M13TG8120. Le fragment *PstI-PstI* de M13TG8120 est ensuite cloné dans le site *PstI* du plasmide pTG9148 générant pTG9150 (le virus VVTG9150 après transfection).

35 pG9148 est d'ailleurs généré de la façon suivante : la séquence correspondant au promoteur H5R du virus de la vaccine est amplifiée par la technique de PCR avec des oligonucléotides introduisant respectivement des sites *BamHI* et *BgIII*. Le fragment d'ADN amplifié est ensuite digéré par *BgIII* et *BamHI* et inséré aux sites

correspondant de M13TG6131 (Gene, 26, 91-99, 1983) générant M13TG8124. Le fragment BamHI-BgIII de M13TG8124 contenant la séquence promotrice H5R est introduit dans le site de restriction BamHI de pTG9133 générant pTG9145. Le plasmide pTG9133 a été construit par introduction d'un site *BamH*I entre les sites *Clal* et *EcoRI* de pTG1H-TK (Nature, 312, 5990, 163-166, 8 Nov. 1984) par ligation d'un adaptateur OTG4451/OTG4452. Un site de clonage multiple issu de M13TG131 digéré par *Bg*II et *EcoRI* est introduit dans les sites *BamH*I et *EcoRI* de pTG9145 générant pTG9148.

En conclusion, VVTG9150 code donc pour une gp160 hybride et soluble dans laquelle la partie gp120 dérive du HIV-1MN, et la partie transmembranaire gp41 provient d'un isolat LA1. Plusieurs modifications sont en outre introduites dans cette séquence codante. Premièrement, un site de restriction *Sph*I est créé immédiatement en aval de la séquence codant pour le peptide signal, sans altérer la séquence en acides aminés. Deuxièmement, un site de restriction *Sma*I est créé immédiatement au-dessus de la séquence de clivage entre la gp120 et la gp41, sans altération de la séquence en acides aminés. Troisièmement, les deux sites de clivage en position 507-516 (numérotation des acides aminés conforme à Myers et al., in : Human retroviruses and AIDS, Los Alamos Nat. Lab., USA, 1994) sont mutés (séquence originale KRR...REKR muté en QNH...QEHN). Quatrièmement, la séquence codant pour le peptide hydrophobique transmembranaire IFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIV (acides minés 689-710 de Myers et al.) est supprimée. Cinquièmement, un codon stop a été substitué pour le second codon E codant PEGIEE (acides aminés 735-740 de Myers et al.), c'est-à-dire le 29<sup>ième</sup> acide aminé du domaine intracytoplasmique.

25

VVTG9150 est ensuite propagé pour produire la gp160 hybride sur des cellules BHK21, dans des conditions conventionnelles (Nature, 312, 163-166, 1984).

La glycoprotéine hybride gp160 est alors purifiée successivement par chromatographies échangeuse d'ions, une chromatographie d'immunoaffinité, une gel filtration, et une concentration. En résumé, on fait passer le milieu de culture contenant la gp160 successivement au travers de deux supports DEAE Trisacryl LS Plus®, mis en équilibre dans des colonnes BPG200® et BPG100® (Pharmacia) avec un tampon pH 8,3 contenant 2,42 g/l de Tris et 1 ml/l de triton X100. Puis on fait passer les fractions d'élution contenant la gp160 au travers d'un support AF-Tresyl Toyopearl® (Tosoh Corp, JP) sur lequel a été greffé l'anticorps IAM5F3 (publication ?) et qui a été mis à l'équilibre dans un tampon composé de 29,22 g/l de

NaCl, 2,42 g/l de Tris et 1 ml/l de triton X100. On collecte l'élution dès l'augmentation de DO visible sur l'écran et ce, jusqu'à la ligne de base. On neutralise ensuite le pH de l'élution avec 4% (v:v) de tampon Tris HCl 2M. On soumet l'élution neutralisée à une filtration surgel dans une colonne XK 50/100® contenant le support sephacryl HR S300 mis à l'équilibre dans un tampon PBS. Si la concentration en protéines est alors inférieure à 0,44 mg/ml, on concentre l'élution dans une cellules Amicon® équipée d'une membrane YM30. Puis, on inactive l'élution ou le concentrat dans un bain marie à 60°C pendant 1 h, et on le filtre (0,22µm) dans un flacon Nalgène®. On peut ainsi obtenir environ 1,34 mg/ml de gp160 pure à 91 % (visualisée sur SDS PAGE).

A partir de 560 µl de gp160 purifiée (1mg/ml), on ajoute 65 µl de tampon 1M phosphate de sodium pH7,8 ; 5,5 µl d'eau distillée et 19,5 µl de dithiothreitol 250 mM (DTT), et on agite au vortex pendant 15 s. On ajoute 51,5 µl de phosphate de sodium 1M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), puis on bloque les groupes sulfhydryls par addition de 95 µl de N-ethyl-maléimide 100mM, on incube pendant 15 min, on réoxyde les groupes sulfhydryls par addition de 32,5 µl de glutathion réduit à 150 mM, et 484 µl de glutathion oxydé à 100 mM, on incube pendant 30 min. On dissocie ensuite les dimères de gp160 par addition de 13,2 µl de dodecyl sulfate de sodium (SDS) à 10%. On place l'échantillon dans une cassette de dialyse d'une capacité de 3 ml contre 3 l de tampon PBS avec 10mM d'octylglucoside. On effectue la dialyse pendant la nuit à température ambiante sous agitation douce. On élimine enfin le détergent par une ou plusieurs nouvelles dialyses contre du tampon PBS. Les gp160 ainsi traitées se retrouvent sous forme de trimères exclusivement.

25

La figure 1 représente l'analyse SDS PAGE en condition réductrice (DTT) obtenue avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée, traitée pour faire des trimères et fixée par l'agent de pontage bi-fonctionnel éthylène-glycol-bis-succinimidyl-succinate (EGS) (col. 3 et 4) ; au regard de celle obtenue en condition réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée et directement fixée par l'EGS (col. 2 : des dimères) ; au regard de celle obtenue en condition réductrice avec des monomères de gp160 (col. 5 et 6) ; et au regard de celle obtenue en condition non-réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150 et purifiée (col. 7 : en absence d'agent réducteur, les liaisons inter-chaines conduisent à la formation de dimères, trimères et tétramères).

## Exemple 2

On exprime par le virus de la vaccine une gp120 prolongée des 129 premiers acides aminés de la partie N-terminale de la gp41, comme décrit par Earl *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 648-652, 1990. Dans la mesure où la partie gp41 est limité à ses 129 premiers acides aminés, celle-ci ne comporte pas de région trans-membranaire. Cette glycoprotéine présente sur gel SDS PAGE un poids moléculaire de l'ordre de 140 kD et est communément appelée gp140.

On purifie cette gp140 successivement par chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'affinité avec des lectines de lentilles, et par gel filtration, comme décrit par Pialoux *et al.* (1995, *supra*) et Salmon-Céron *et al.* (1995, *supra*).

A partir de 100 µl de gp140 purifiée (1mg/ml), on ajoute 2 µl de dithiothreitol 250 mM (DTT), et 10 µl de SDS (10%), on incube le mélange pendant 15 min, on lui ajoute 20 µl de glutathion oxydé (250mM), on l'incube une nuit à 4°C, puis on place l'échantillon dans une cassette de dialyse d'une capacité de 3 ml contre 3 l de tampon PBS contenant 10mM d'octylglucoside. On effectue la dialyse pendant la nuit à température ambiante sous agitation douce. On élimine enfin le détergent par une ou plusieurs nouvelles dialyses contre du tampon PBS. Contre toute attente, cette méthode permet d'éliminer tous les ponts disulfures inter-chaînes sans que l'on ait à bloquer les groupes sulfhydryls avec un agent alkylant. Les gp140 ainsi traitées se retrouvent sous forme de trimères exclusivement.

### Exemple 3

25

On exprime par le virus de la vaccine une gp160 telle que décrite par Kieny et al. (Protein Engineering, 2, 219-225, 1988). On la purifie comme décrit à l'exemple 1, puis on la traite avec du SDS, et on la dialyse contre un tampon PBS contenant 10mM d'octylglucoside. On obtient après traitement un mélange de trimères non-covalents et de dimères covalents de la gp160, la forme prédominante étant constituée de trimères.

**Revendications**

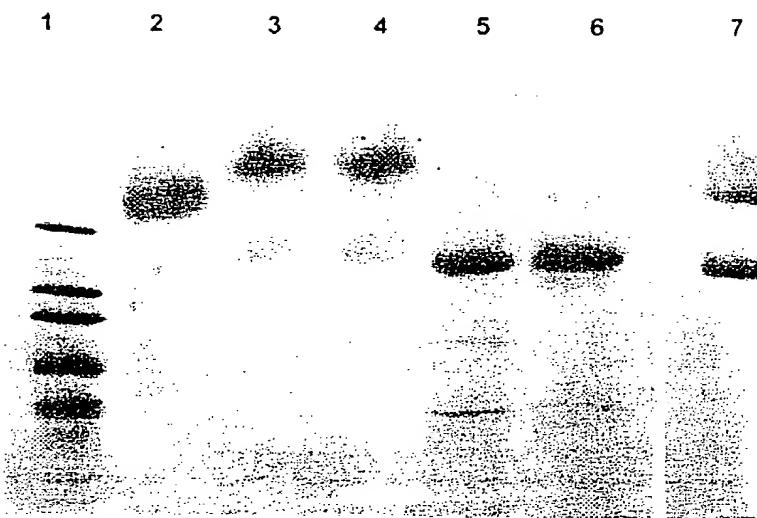
1. Glycoprotéine recombinante purifiée répondant aux propriétés suivantes :
  - 5 a) une capacité d'adhésion au CD4 ;
  - b) une affinité avec un anticorps anti-gp120 capable de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV;
  - c) une affinité avec un anticorps anti-gp41 ;
  - d) une forme trimérique dépourvue de ponts disulfures inter-chaînes.
- 10 2. Glycoprotéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la glycoprotéine est composée de tout ou partie de la gp160.
- 15 3. Glycoprotéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend moins de 50% d'autres contaminants protéiques.
- 20 4. Glycoprotéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la capacité d'adhésion au CD4 est au moins identique à celle d'une gp120 d'un HIV infectieux.
5. Vaccin comprenant la glycoprotéine purifiée selon la revendication 1, et un adjuvant.
- 25 6. Vaccin selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il contient comme antigène de surface du HIV uniquement la glycoprotéine selon la revendication 1.
- 30 7. Procédé d'obtention d'une glycoprotéine selon la revendication 1, dans lequel on exprime, aux moyen de techniques de recombinaison génétique, une glycoprotéine répondant aux propriétés a), b) et c) énoncées à la revendication 1, on la purifie, et on la soumet à des étapes impliquant au moins un agent réducteur, un détergent ionique et/ou un détergent neutre dans des conditions telles que l'on obtient une glycoprotéine répondant aux conditions énoncées à la revendication 1.
- 35 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on soumet la glycoprotéine purifiée successivement à un agent réducteur, à un agent d'alkylation, à un agent oxydant, à un détergent ionique, et à une dialyse contre un détergent neutre.

9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on soumet la glycoprotéine purifiée successivement à un détergent ionique, à un agent réducteur, à un agent oxydant, et à une dialyse contre un détergent neutre.
- 5 10. Utilisation de la glycoprotéine selon la revendication 1 dans la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* d'infections causées par HIV.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/1

Figure 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte      onal Application No  
PCT/FR 99/01871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/21 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WYATT R ET AL: "The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein 'see comments!'"  <i>NATURE</i>, (1998 JUN 18) 393 (6686) 705-11.  JOURNAL CODE: NSC. ISSN: 0028-0836.,  XP002101350  ENGLAND: United Kingdom  page 710, left-hand column, paragraph 2 -  last paragraph  ----  -/-</p>	1-6

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 1999

Date of mailing of the international search report

20/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No  
PCT/FR 99/01871

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.P. MOORE AND J. BINLEY: "Envelope's letters boxed into shape" NATURE, vol. 393, no. 6686, 18 June 1998 (1998-06-18), pages 630-631, XP002101351 LONDON GB page 631, left-hand column, paragraph 4 -middle column, paragraph 2 ----	1-6
X	WO 94 00557 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ; PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC (FR); MADJAR J.) 6 January 1994 (1994-01-06) cited in the application page 8, line 24 -page 9, line 13; claims; examples ----	1-5, 10
A	LU M ET AL: "A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein." NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, (1995 DEC) 2 (12) 1075-82. JOURNAL CODE: B98. ISSN: 1072-8368., XP002101352 United States cited in the application page 1080, left-hand column, paragraph 3 -page 1081, left-hand column, paragraph 3 ----	1
P, A	WO 99 16883 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 8 April 1999 (1999-04-08) claims; figure 1; examples -----	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01871

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9400557 A	06-01-1994	FR 2692898 A		31-12-1993
		AU 4504793 A		24-01-1994
WO 9916883 A	08-04-1999	AU 9678598 A		23-04-1999

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No  
PCT/FR 99/01871

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/49 C07K14/16 A61K39/21 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K C12N G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WYATT R ET AL: "The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein 'see comments!'"          NATURE, (1998 JUN 18) 393 (6686) 705-11.          JOURNAL CODE: NSC. ISSN: 0028-0836.,          XP002101350          ENGLAND: United Kingdom          page 710, colonne de gauche, alinéa 2-          dernier alinéa</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-6

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

De: \_\_\_\_\_  
é Internationale No:  
PCT/FR 99/01871

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J.P. MOORE AND J. BINLEY: "Envelope's letters boxed into shape" NATURE, vol. 393, no. 6686, 18 juin 1998 (1998-06-18), pages 630-631, XP002101351 LONDON GB page 631, colonne de gauche, alinéa 4 -colonne du milieu, alinéa 2 ----	1-6
X	WO 94 00557 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ; PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC (FR); MADJAR J.) 6 janvier 1994 (1994-01-06) cité dans la demande page 8, ligne 24 -page 9, ligne 13; revendications; exemples ----	1-5,10
A	LU M ET AL: "A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein." NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, (1995 DEC) 2 (12) 1075-82. JOURNAL CODE: B98. ISSN: 1072-8368., XP002101352 United States cité dans la demande page 1080, colonne de gauche, alinéa 3 -page 1081, colonne de gauche, alinéa 3 ----	1
P,A	WO 99 16883 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 8 avril 1999 (1999-04-08) revendications; figure 1; exemples -----	1-10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à membres de familles de brevets

Der. Internationale No

PCT/FR 99/01871

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9400557 A	06-01-1994	FR 2692898 A AU 4504793 A	31-12-1993 24-01-1994
WO 9916883 A	08-04-1999	AU 9678598 A	23-04-1999

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**